



ISMJ 2013; 16(3): 167-80

فصلنامه طب جنوب

پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

سال شانزدهم، شماره ۳، صفحه ۱۸۰ - ۱۶۷ (پاییز ۱۳۹۲)

بیان ژنهای FOXP3، CTLA-4 و اینترلوکین ۱۰ در بیماران

با سرطان حنجره و متاستازهای وابسته

علیرضا بوالخیر^۱، بیژن خادمی^۲، مجتبی حبیب آگهی^۳، عباس قادری^۴احمد حسینی^۴، منصوره جابری پور^{*۴}^۱ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز^۲ گروه گوش و حلق و بینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز^۳ گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز^۴ مرکز تحقیقات سرطان شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

(دریافت مقاله: ۹۱/۱۲/۱۵ - پذیرش مقاله: ۹۲/۲/۷)

چکیده

زمینه: سلولهای Treg قویترین منع کننده ایمنی ضدتورمورال هستند و بیان CTLA-4 برای عملکرد سلولهای تنظیمگر+FOXP3 T طبیعی مادام که این ملکول را بیان می کنند، ضروری می باشد. اینترلوکین ۱۰ نیز به عنوان یک عامل منع کننده ایمنی، در عرضه آنتی ژن به صورت مؤثر عمل کرده و فعالیت سلولهای T اختصاصی تومورال را با مانع یا محدودیت توأم می کند. هدف از این بررسی مقایسه بیان و کمیت بیان ژنهای FOXP3 و CTLA-4 و اینترلوکین ۱۰ میان بیماران با تهاجم موضعی سرطان حنجره و بیماران بدون تهاجم موضعی و نیز میان بیماران با درگیری غدد لنفاوی است.

مواد و روش ها: بیان و کمیت بیان ژنهای FOXP3، CTLA-4 و اینترلوکین ۱۰ در نمونه های بافتی ۵۹ بیمار با سرطان حنجره که ۸ نفر از آنها متاستاز منطقه ای داشتند و ۳۱ نمونه از غدد لنفاوی آنها به روش Real-Time PCR اندازه گیری شد.

یافته ها: با مقایسه بیان و کمیت بیان ژنهای FOXP3، CTLA-4 و اینترلوکین ۱۰ میان بیماران با تهاجم موضعی سرطان حنجره و بیماران بدون تهاجم موضعی و نیز میان بیماران با درگیری غدد لنفاوی در مقایسه با بیماران فاقد درگیری غدد لنفاوی تفاوت چشمگیری مشاهده نگردید ($P > 0.05$). همچنین همبستگی چشمگیر آماری میان بیان این ژنها و مراحل گوناگون تومور و درجه تمایز تومور یافت نشد ($P > 0.05$).

نتیجه گیری: سطح بیان ژنهای FOXP3، CTLA-4 و اینترلوکین ۱۰ در ریز محیط تومورهای حنجره با میزان تهاجم موضعی و با درگیری غدد لنفاوی در این بیماران ارتباط چشمگیری ندارد.

واژگان کلیدی: سرطان حنجره، FOXP3، CTLA-4، اینترلوکین ۱۰

*شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سرطان شناسی

مقدمه

کارسینوم سلول سنگفرشی سر و گردن (HNSCC)^۱ هشتمین سرطان شایع در سراسر دنیا است و حدوداً شش درصد از تمام سرطان‌ها را به خود اختصاص می‌دهد (۱).

حنجره شایع‌ترین مکان HNSCC بوده و در ایران نیز مانند دیگر مکان‌های دنیا، شایع‌ترین تومور بدخیم حنجره کارسینوم سلول سنگفرشی است (۲).

شایع‌ترین سن بروز این تومور در ایران ۶۰ سالگی است و نسبت مردان به زنان (۹/۵ به ۱) بوده و تومور ناحیه‌ی فوق گلو تیک^۲ از گلو تیک در ایران شایع‌تر می‌باشد (۳).

مطالعات اخیر، به نقش پاسخ‌های ایمنی میزبان در پیشرفت HNSCC پرداخته‌اند و چنین به نظر می‌رسد که لنفوسیت‌های T ممکن است نقشی در کنترل رشد تومور داشته باشند. چندین آنتی‌ژن وابسته به HNSCC که به صورت طبیعی فراوری شده و ارائه^۳ می‌گردد شناسایی شده و به نظر می‌رسد که این آنتی‌ژن‌ها توسط لنفوسیت‌های T ویژه‌ی CD۴+ و CD۸+ شناخته می‌شوند (۴). اغلب در بیماران HNSCC فعالیت‌های ضد توموری لنفوسیت‌های T رده‌ی CD۸+، اختلال دارند و نقش سلول‌های T رده‌ی CD۴+ بسیار پیچیده بوده و همان‌گونه که زیر مجموعه‌ای از سلول‌های T رده‌ی CD۴+ در آغاز و نگهداشت پاسخ‌های ایمنی ضد سرطانی^۴ نقش دارند، گروهی دیگر نیز در کاهش این پاسخ‌ها مؤثرند (۵).

فرار ایمنی^۵، برجستگی سرطان‌ها محسوب می‌گردد و

تومورها با ایجاد شرایط تحمل‌پذیری غیرفعال در راه "فرار ایمنی" بر می‌آیند (۴).

نوع فعال تحمل‌پذیری از طریق منع پاسخ‌های وابسته به سلولی ضد تومورال توسط سلول‌های Treg ارتشاح یاته توموری^۶ و سلول‌های منع‌کننده‌ی برآمده از میلوئید، روی می‌دهد (۶). فرار ایمنی از ویژگی‌های HNSCC است و سلول‌های تنظیم‌کننده‌ی T (Treg) در پیشرفت HNSCC با منع کردن ایمنی ضد تومورال نقش ایفا می‌نمایند (۵).

به‌طور کلی، سلول‌های Treg، قوی‌ترین منع‌کننده‌ی ایمنی ضد تومورال بوده و به‌عنوان بزرگترین سد در راه ایمن درمانی، محسوب می‌شوند. در اولین مراحل سرطان، سلول‌های Treg در توده‌ی توموری انباشت می‌یابند (۷). در سرطان، سلول‌های Treg به صورت انتخابی توسط کموکین‌های تولید شده‌ی توموری و ماکروفاژهای ریز محیط به تومورها ترافیک می‌یابند (۸). سلول‌های Treg موجب منع فعالیت سلول‌های T محیطی، به‌ویژه زیر مجموعه‌ی سیتوتوکسیک شده و با کاهش عرضه‌ی آنتی‌ژن و ارتقاء فعالیت‌های منع‌کننده‌ی سیستم ایمنی سلول‌های دندریتیک، مونوسیت‌ها و ماکروفاژها، موجب کاهش ایمنی ضد تومورال می‌گردند (۹).

سلول‌های Tregs طبیعی^۷ تقریباً ۵ تا ۱۰ درصد از سلول‌های T رده‌ی CD۸+ محیطی را به خود اختصاص می‌دهند. تاکنون، مارکر واحدی برای شناسایی Tregs طبیعی شناخته نشده است ولی این سلول‌ها مقادیر سطح بالایی از مارکر سطحی CD۲۵ همراه با FOXP3 که به ترتیب ضروری برای ابقاء، تکامل و فعالیت Tregs طبیعی هستند،

^۱ Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

^۲ Supraglottic

^۳ Present

^۴ Anticancer immune responses

^۵ Immune escape

^۶ Tumor-infiltrating

^۷ n Tregs

بیان می‌کنند (۱۰).

سلول‌های Treg در بیماران HNSCC در مقایسه با گروه شاهد، افزایش می‌یابند و این یافته نشانگر آن است که افزایش سلول‌های Treg می‌تواند مکانیسمی باشد که چگونه تومورها، فرار ایمنی خود را به انجام می‌رسانند (۵ و ۱۱).

در مطالعه‌ای دیگر نیز سلول‌های Treg در ضایعات کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی یافت گردید که به نظر می‌رسد موجب منع پاسخ‌های ایمنی در سطح سیستمیک و ریز محیط تومور می‌شوند (۱۲).

آنتی‌ژن لئوسیت T سیتوتوکسیک-۴ (CTLA-4)^۸، به عنوان یک ملکل منع کنندگی همراه^۹ نقش مهمی در تحمل^{۱۰} ایمونولوژیک و کنترل منفی پاسخ‌های ایمنی دارد. نقش آن به عنوان یک القاء کننده سیگنال‌های منفی درون سلولی به سلول‌های T اثر کننده^{۱۱} به خوبی شناخته شده است؛ اما دلایل فراوانی وجود دارند که نشان می‌دهند CTLA-4 برای عملکرد سلول‌های تنظیم‌گر T FOXP3+ طبیعی مادام که این ملکل را بیان می‌کنند، ضروری می‌باشد. کمبود CTLA-4 در سلول‌های FOXP3+Treg موجب اختلال در عملکرد منع کنندگی این سلول‌ها می‌شود. چندین مکانیسم وجود دارد که بر نقش CTLA-4 در منع کنندگی وابسته به سلول‌های Treg دلالت می‌کنند. برای مثال، سلول‌های FOXP3+ Treg از طریق CTLA-4 موجب کاهش بیان CD۸۰ و CD۸۶ سلول‌های دندریتی پس از تحریک آنتی‌ژنی می‌شوند (۱۳). آنتی بادی‌هایی که برهم کنش CTLA-4 با لیگاند‌های آن یعنی BV/۱ و BV/۲ را بلاک می‌کنند، می‌توانند موجب افزایش پاسخ‌های

ایمنی ضد تومورال شوند و از این رو آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد CTLA-4، رهیافت‌های درمانی سرطان را تغییر داده‌اند (۱۴).

اینتروکین ۱۰ به عنوان یک عامل منع کننده ایمنی، در عرضه آنتی ژن به صورت مؤثر عمل کرده و فعالیت سلول‌های T اختصاصی تومورال را با مانع یا محدودیت توأم می‌کند. این اینترلوکین از سلول‌های تومورال، سلول‌های توموری تحت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و توسط لکوسیت‌های محیطی آزاد می‌شود (۱۵).

هر چند ارتباط میان اینترلوکین ۱۰ و سرطان به صورت گسترده تحت مطالعه قرار گرفته است، نقش تولید این اینترلوکین در ریز محیط تومور که توسط سلول‌های بدخیم، لئوسیت‌ها و ماکروفاژهای اینفیلتره شده توموری ادامه می‌یابد، هنوز مورد بحث است (۱۶).

اینتروکین ۱۰ می‌تواند موجب رشد تومور در شرایط *in vitro* با تحریک تکثیر سلول‌ها و منع آپوپتوز سلولی شود (۱۷ و ۱۸).

در یک مطالعه نشان داده شد که زیر مجموعه‌ای خاص از سلول‌های T تنظیم‌گر FOXP3+ CD۴+CD۲۵+high با ترشح اینترلوکین ۱۰ و TGF-B1^{۱۲} اثر منع کنندگی در ریز محیط توموری در بیماران HNSCC از خود نشان می‌دهند.

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که عملکردهای منع کننده سلول‌های Treg که در لئوسیت‌های اینفیلتره شده توموری وجود دارند ممکن است با بقاء کم بیماران HNSCC پیشرفته توأم گردد (۱۹). همچنین سطح بالایی از TGF-B1 و اینترلوکین ۱۰ در ضایعات بافتی کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی

^۸ Cytotoxic T Lymphocyte antigen-4

^۹ Co-inhibitory

^{۱۰} Tolerance

^{۱۱} Effector

^{۱۲} Transforming Growth Factor-B1

در مقایسه با نمونه‌های بافتی افراد گروه کنترل، مشاهده شد (۱۲).

در یک فراگرد، درک مکانیسم بالا رفتن سلول‌های Treg در ریز محیط سرطان‌ها و گردش خون که توأم با پیش آگهی بد و کاهش بقاء است می‌تواند در شناخت مکانیسم‌های سلولی و ملکولی این سلول‌ها در اثرگذاری ایمن درمانی در رویارویی با سرطان‌ها نقش مهمی را ایفا نماید (۲۰).

هدف مطالعه‌ی کنونی بررسی مقایسه بیان و کمیت بیان ژن‌های FOXP3 و CTLA-4 و اینترلوکین ۱۰ میان بیماران با تهاجم موضعی سرطان حنجره و بیماران بدون تهاجم موضعی و نیز میان بیماران با درگیری غدد لنفاوی در مقایسه با بیماران بدون درگیری غدد لنفاوی و همچنین بررسی همبستگی میان بیان این ژن‌ها و مراحل گوناگون و درجه تمایز تومور در سرطان حنجره است.

مواد و روش‌ها

بیماران

در این مطالعه ۵۹ بیمار با سرطان حنجره که ۸ نفر از آنها متاستاز و بقیه سرطان حنجره بدون متاستاز داشتند و از فروردین ۱۳۸۹ لغایت فروردین ۱۳۹۰ به بیمارستان خلیلی شیراز مراجعه کرده بودند، انتخاب گردیدند. هیچ‌کدام از بیماران متاستاز دوردست نداشتند. بیماران تحت شیمی درمانی و رادیوتراپی قرار گرفته از مطالعه حذف گردیدند. بیوپسی تومور و غدد لنفاوی وابسته به آن توسط متخصص مربوطه گرفته و به بخش‌های پاتولوژی و مرکز تحقیقات سرطان فرستاده شد.

بررسی‌های پیش از عمل شامل لارنگوسکوپی فیبروآپتیک، عکس ساده‌ی سینه، سونوگرافی از ناحیه

گردن و شکم و CT اسکن از ناحیه‌ی گردن بود. مرحله‌بندی تومور^{۱۳} بر اساس سیستم مرحله‌بندی TNM اتحاد بین‌المللی بر علیه سرطان^{۱۴} انجام پذیرفت. درمان در جایی شامل برداشت کامل و یا قسمتی از حنجره، بر اساس اندازه‌ی تومور اولیه، انجام پذیرفت.

جداسازی RNA

RNA کامل از نمونه‌های بافتی توسط RNA invisorb II (Invitex، آلمان) بر اساس دستورالعمل سازنده در کیت استخراج گردید. به‌طور خلاصه، ۵۰ میلی‌گرم از هموژنیت بافتی توسط اسکالپل به لوله‌ی سانتریفیوژ ۱/۵ سی‌سی انتقال داده شد. سپس، میزان ۵۰۰ میکرولیتر از محلول لیز به هر تیوب اضافه گردیده و در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه گذاشته شد. آنگاه ۳۰ میکرولیتر از adsorbin به هر تیوب اضافه شده و بر روی یخ برای پنج دقیقه انکوبه گردید. تمام نمونه‌ها در RPM ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ و پس از رسوب‌گذاری، مایع supernatant به تیوب سانتریفیوژ ۱/۵ سی‌سی انتقال داده شد. میزان ۵۰۰ میکرولیتر تریزول (Invitogen، انگلستان) و ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر تیوب، به‌ترتیب اضافه گردید. پس از چند بار بالا و پایین نمودن، نمونه‌ها با سرعت بالا برای ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و RNA در فاز بالایی با ایزوپروپانول ۱۰۰ درصد رسوب‌دهی شد. رسوب RNA با اتانول ۷۵ درصد شستشو و در آب تیمار شده با DEPC جدا شسته شدند.

کیفیت و کمیت نمونه‌های RNA استخراج شده توسط اسپکتروفوتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و

¹³ Tumor staging

¹⁴ UICC, 2002

۲۸۰ نانومتر مورد تأیید قرار گرفتند. برای پرهیز از آلودگی، RNA با DNAase I (Invitrogen Giko، انگلستان)، پیش از سنتز cDNA مورد تیمار قرار گرفت.

ترا نوشت معکوس

cDNA با ۵ میکروگرم از RNA کامل با استفاده از کیت سنتز نخست رشته cDNA کمک معکوس^{۱۵} (Fermentase، لیتوانی) براساس دستورالعمل کیت، سنتز گردید. به طور خلاصه، ۵ میکروگرم از RNA و یک میکرولیتر اولیگو dT و یک میکرولیتر پرایمر هگزامر تصادفی، با حجم کلی ۱۲ میکرولیتر به تیوب‌های نیم سی‌سی اپندروف اضافه گردید و برای پنج دقیقه در ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برای پنج دقیقه در درای بلاک (Techne، کره) انکوبه شد. سپس تیوب‌ها بر روی یخ انتقال داده شد و ۴ میکرولیتر بافر واکنش، ۲ میکرولیتر dNTP (۱۰mM) و یک میکرولیتر منع‌کننده‌ی RNAase به هر تیوب اضافه شد و تیوب‌ها برای پنج دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و برای پنج دقیقه در ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس، یک میکرولیتر از آنزیم ترانسکریپتاز (پنج واحد) به تمام تیوب‌ها اضافه شد و نمونه‌ها در ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۹۰ دقیقه در ترمال سیکلر (اپندروف، آلمان) انکوبه شدند.

در نهایت، آنزیم ترانسکریپتاز معکوس در ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه غیرفعال شده و cDNA در ۷۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تا آزمایش‌های بعدی نگهداری شد.

۲۸۰ نانومتر مورد تأیید قرار گرفتند. برای پرهیز از آلودگی، RNA با DNAase I (Invitrogen Giko، انگلستان)، پیش از سنتز cDNA مورد تیمار قرار گرفت.

ترا نوشت معکوس

cDNA با ۵ میکروگرم از RNA کامل با استفاده از کیت سنتز نخست رشته cDNA کمک معکوس^{۱۵} (Fermentase، لیتوانی) براساس دستورالعمل کیت، سنتز گردید. به طور خلاصه، ۵ میکروگرم از RNA و یک میکرولیتر اولیگو dT و یک میکرولیتر پرایمر هگزامر تصادفی، با حجم کلی ۱۲ میکرولیتر به تیوب‌های نیم سی‌سی اپندروف اضافه گردید و برای پنج دقیقه در ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برای پنج دقیقه در درای بلاک (Techne، کره) انکوبه شد. سپس تیوب‌ها بر روی یخ انتقال داده شد و ۴ میکرولیتر بافر واکنش، ۲ میکرولیتر dNTP (۱۰mM) و یک میکرولیتر منع‌کننده‌ی RNAase به هر تیوب اضافه شد و تیوب‌ها برای پنج دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و برای پنج دقیقه در ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس، یک میکرولیتر از آنزیم ترانسکریپتاز (پنج واحد) به تمام تیوب‌ها اضافه شد و نمونه‌ها در ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۹۰ دقیقه در ترمال سیکلر (اپندروف، آلمان) انکوبه شدند.

در نهایت، آنزیم ترانسکریپتاز معکوس در ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه غیرفعال شده و cDNA در ۷۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تا آزمایش‌های بعدی نگهداری شد.

Real-time -PCR کمی (qRT-PCR)

بیان و کمیت ترانوشست ژنی FOXP3، CTLA4 و اینترلوکین ۱۰ با استفاده از سیستم Bio-Rad (دکتور

جدول ۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

توالی رو به جلو	توالی معکوس	ژن
CATGATCAGCCTCACACCAC	CCACTTGCAGACACCATTTG	FOXP3
CTCAGCTGAACCTGGCTACC	CTTCAGTCACCTGGCTGTCA	CTLA4

ترمال سیکلینگ برای تمام ژن‌ها در گام دینچراسیون در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه تنظیم گردید که با ۴۰ سیکل (دینچراسیون در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، تافتن در ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و امتداد در ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۶۰ دقیقه مادامی که فلورسنت آشکار شد، انجام گردید). محصولات تکثیری qRT-PCR با تحلیل منحنی ذوب، مورد بررسی قرار گرفتند.

¹⁶ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

¹⁵ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit

تحلیل آماری

مقادیر FOXP3، CTLA4 و ترانوشت ژنی IL-10 بین بیماران متاستازی و غیرمتاستازی با آزمون غیرپارامتری Mann-Whitney توسط نرم‌افزار SPSS (USA, IL, Chicago, SPSS Inc) ویرایش ۱۱/۵ (شیکاگو، آمریکا) انجام گردید. بیان نسبی ژن‌ها با برنامه‌ی نرم‌افزاری Prism 4 (سانتیاگو، آمریکا، ۲۰۰۳) به‌صورت نمودار کشیده شد. در همه‌ی تحلیل‌های آماری ارزش P کمتر از ۰/۰۵ به‌صورت معنادار محسوب گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه ۵۹ نمونه‌ی بافتی و ۳۱ نمونه از غدد لنفاوی تحت بررسی قرار گرفتند. میانگین سنی بیماران 60 ± 11 سال بود و ۵۷ بیمار (۹۶/۶۲ درصد) مرد و ۲ بیمار (۳/۳۸ درصد) زن بودند. تعداد ۵۷ نفر (۹۶/۶۲ درصد) از بیماران کارسینوم سلول سنگفرشی داشتند و یک بیمار (۱/۶۹ درصد) نیز کارسینوم نورواندوکراین سلول کوچک^{۱۷} و بیمار دیگر نیز کارسینوم وروکوز^{۱۸} داشت. از میان بیماران، ۸ نفر (۱۳/۵۶ درصد) درگیری غدد لنفاوی و ۸ نفر نیز درگیری موضعی^{۱۹} داشتند. درگیری غده‌ی تیروئید در ۴ نفر (۶/۷۷ درصد) از بیماران یافت شد. درگیری پیش حنجره^{۲۰} در ۳۶ بیمار (۶۱/۰۱ درصد) دیده شد. متاستاز دور و درگیری غده‌ی پاراتیروئید در هیچ‌کدام از بیماران یافت نگردید. تنها در یک فرد درگیری مری (۱/۶۹ درصد) و در نفر دیگر درگیری نای (۱/۶۹ درصد) دیده شد.

درجه‌ی تمایز تومور براساس گزارش پاتولوژی به این

شرح بود: ۳۵/۵۹ درصد خوب، ۴۲/۳۷ درصد متوسط و ۱۸/۶۴ درصد ضعیف. درگیری مخاط بر اساس گزارش پاتولوژی نیز به این شرح بود: بدون تغییرات در ۳۸/۹۸ درصد، در جا^{۲۱} در ۱/۶۹ درصد، تهاجم اندک^{۲۲} در ۳/۳۸ درصد، کم در ۲۳/۷۲ درصد، متوسط در ۱۶/۹۴ درصد، شدید در ۱/۶۹ درصد، متاپلازی در ۱/۶۹ درصد، تغییرات دیسپلاستیک در ۵/۰۸ درصد و Missed در ۶/۷۷ درصد.

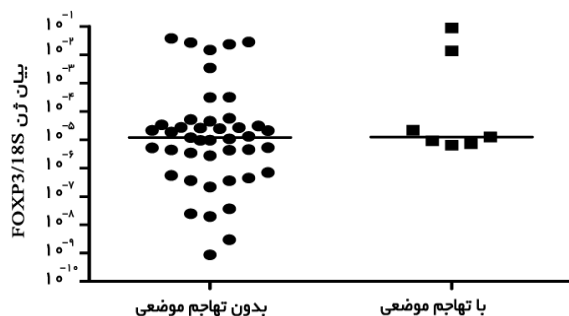
بیان ژن‌های FOXP3، CTLA-4 و اینترلوکین ۱۰

در بافت حنجره و غدد لنفاوی

RNA از ۵۹ نمونه با موفقیت استخراج شد که ۵۱ بیمار بدون تهاجم موضعی^{۲۳} و ۸ نفر نیز دچار تهاجم موضعی بودند. از ۸ بیمار با تهاجم موضعی، ۷ بیمار دارای نتایج قابل قبول PCR بودند.

الف) FOXP3+

از لحاظ بیان ژن FOXP3+، میان بیماران با تهاجم موضعی سرطان حنجره و بیماران بدون تهاجم موضعی، تفاوت معنی دار آماری یافت نگردید ($P > 0/05$) (نمودار ۱). همچنین همبستگی چشمگیر آماری میان بیان ژن FOXP3 و مراحل گوناگون تومور^{۲۴} دیده نشد ($P > 0/05$) (نمودار ۲).



نمودار ۱) بیان ژن FOXP3 در بافت سرطان حنجره با و بدون تهاجم موضعی

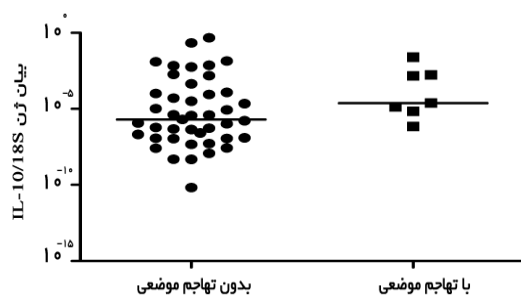
²¹ in situ
²² Micro invasion
²³ Local invasion
²⁴ Stage

¹⁷ Oat Cell carcinoma
¹⁸ Verrucous
¹⁹ Local invasion
²⁰ Prelaryngeal

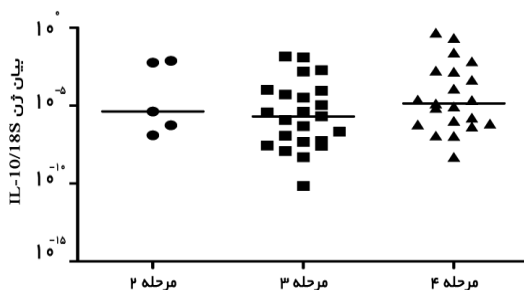
سرطان حنجره

ب) اینترلوکین ۱۰

از لحاظ بیان ژن IL-10، میان بیماران با تهاجم موضعی سرطان حنجره و بیماران بدون تهاجم موضعی، تفاوت معنی‌دار آماری یافت نگردید ($P > 0.05$) (نمودار ۴). همچنین همبستگی چشمگیر آماری میان بیان ژن IL-10 و مراحل گوناگون تومور (stage) دیده نشد ($P > 0.05$) (نمودار ۵).

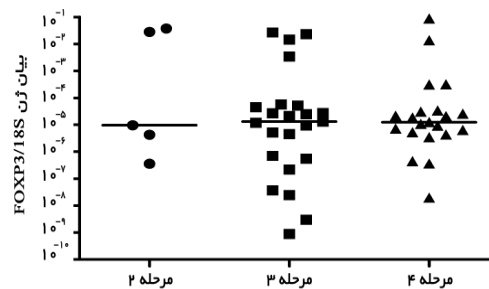


نمودار ۴) بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در بافت سرطان حنجره با و بدون تهاجم موضعی



نمودار ۵) بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در بافت سرطان حنجره در مراحل گوناگون تومور

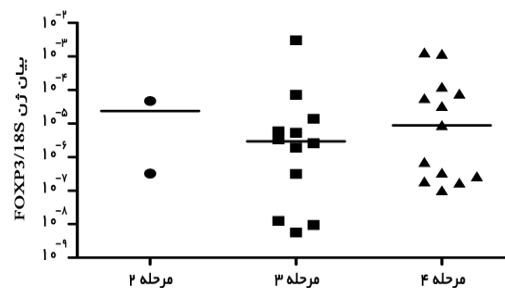
تفاوت معنی‌دار آماری میان بیماران با درگیری پیش حنجره و دیگر بیماران از لحاظ بیان ژن IL-10 در بافت سرطان حنجره یافت نشد ($P > 0.05$). همچنین میان میزان‌های گوناگون تمایز تومور تفاوت معنی‌دار آماری از لحاظ بیان ژن اینترلوکین ۱۰ یافت نگردید ($P > 0.05$). از لحاظ غدد لنفاوی نیز، تفاوت چشمگیر آماری در بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در بیماران با درگیری غدد لنفاوی در مقایسه با بیماران



نمودار ۲) بیان ژن FOXP3 در بافت سرطان حنجره در مراحل گوناگون تومور

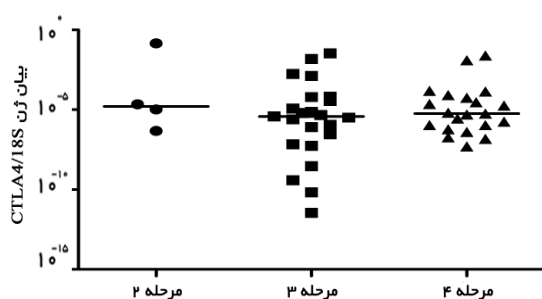
تفاوت معنی‌دار آماری میان بیماران با درگیری پیش حنجره و دیگر بیماران از لحاظ بیان ژن FOXP3 در بافت سرطان حنجره یافت نشد ($P > 0.05$).

همچنین میان میزان‌های گوناگون تمایز تومور^{۲۵} تفاوت معنی‌دار آماری از لحاظ بیان ژن FOXP3 یافت نگردید ($P > 0.05$). از لحاظ غدد لنفاوی نیز، تفاوت چشمگیر آماری در بیان ژن FOXP3 در بیماران با درگیری غدد لنفاوی در مقایسه با بیماران فاقد درگیری غدد لنفاوی مشاهده نگردید ($P > 0.05$). همچنین آنالیز بیان ژن FOXP3 در غدد لنفاوی حاکی از آن بود که ارتباطی معنی‌دار میان میزان تمایز تومور و بیان این ژن وجود نداشت ($P > 0.05$). افزون بر این، بیان ژن FOXP3 در غدد لنفاوی با مراحل گوناگون تومور^{۲۶}، تفاوت معنی‌دار آماری از خود نشان نداد ($P > 0.05$) (نمودار ۳).



نمودار ۳) بیان ژن FOXP3 در غدد لنفاوی در بیماران با مراحل گوناگون

^{۲۵} Tumor differentiation^{۲۶} Tumor stages



نمودار ۸) بیان ژن CTLA-4 در بافت سرطان حنجره در مراحل گوناگون تومور

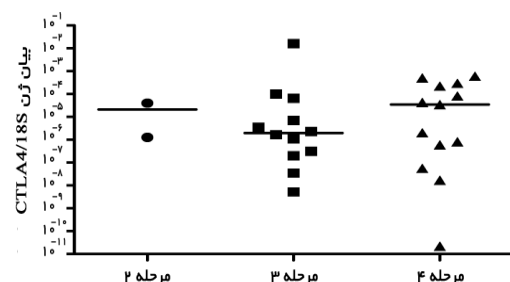
تفاوت معنی‌دار آماری میان بیماران با درگیری prelaryngeal و دیگر بیماران از لحاظ بیان ژن CTLA-4 در بافت سرطان حنجره یافت نشد ($P > 0.05$).

همچنین میان میزان‌های گوناگون تمایز تومور پیش حنجره تفاوت معنی‌دار آماری از لحاظ بیان ژن CTLA-4 یافت نگردید ($P > 0.05$).

از لحاظ غدد لنفاوی نیز، تفاوت چشمگیر آماری در بیان ژن CTLA-4 در بیماران با درگیری غدد لنفاوی در مقایسه با بیماران فاقد درگیری غدد لنفاوی مشاهده نگردید ($P > 0.05$).

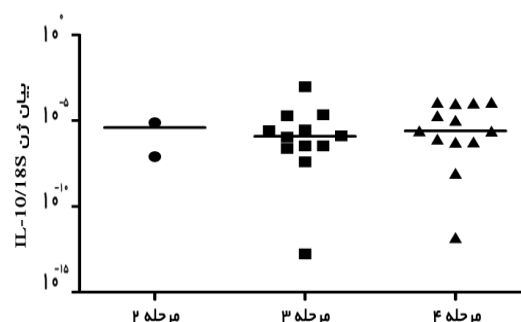
همچنین آنالیز بیان ژن CTLA-4 در غدد لنفاوی حاکی از آن بود که ارتباطی معنی‌دار میان میزان تمایز تومور و بیان این ژن وجود نداشت ($P > 0.05$).

افزون بر این، بیان ژن CTLA-4 در غدد لنفاوی با مراحل گوناگون تومور، تفاوت معنی‌دار آماری از خود نشان نداد ($P > 0.05$) (نمودار ۹).



نمودار ۹) بیان ژن CTLA-4 در غدد لنفاوی در بیماران با مراحل گوناگون سرطان حنجره

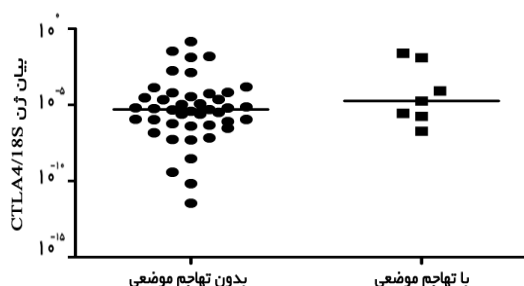
فاقد درگیری غدد لنفاوی مشاهده نگردید ($P > 0.05$). همچنین آنالیز بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در غدد لنفاوی حاکی از آن بود که ارتباطی معنی‌دار میان میزان تمایز تومور و بیان این ژن وجود نداشت ($P > 0.05$). افزون بر این، بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در غدد لنفاوی با مراحل گوناگون تومور، تفاوت معنی‌دار آماری از خود نشان نداد ($P > 0.05$) (نمودار ۶).



نمودار ۶) بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در غدد لنفاوی در بیماران با مراحل گوناگون سرطان حنجره

ج) CTLA-4

از لحاظ بیان ژن CTLA-4، میان بیماران با تهاجم موضعی سرطان حنجره و بیماران بدون تهاجم موضعی، تفاوت معنی‌دار آماری یافت نگردید ($P > 0.05$) (نمودار ۷). همچنین همبستگی چشمگیر آماری میان بیان ژن CTLA-4 و مراحل گوناگون تومور دیده نشد ($P > 0.05$) (نمودار ۸).



نمودار ۷) بیان ژن CTLA-4 در بافت سرطان حنجره با و بدون تهاجم موضعی

بحث

همان‌گونه که اشاره شد FOXP3 نقش اساسی در رشد و عملکرد سلول‌های Treg تحت عنوان FOXP3+Treg+CD4+CD25+ cell دارد. بیان FOXP3 منحصر به بافت‌های لنفوئیدی مانند تیموس، طحال و غدد لنفاوی نمی‌شود و نشان داده شده است که FOXP3 در سلول‌های توموری پانکراس، سرطان سینه، ملانوم، سرطان ریه و سرطان کلون نیز بیان می‌شود (۲۰). به نظر می‌رسد که FOXP3 عامل چند چهره، با عملکردهای متضادی در زیست‌شناسی سرطان باشد. در کارسینوم پانکراس و ملانوم، FOXP3 نقش افزایش دهنده‌ی تومور از طریق Treg و اثر بر روی تحمل^{۲۷} تومور دارد (۲۱ و ۲۲). در سرطان سینه و پروستات FOXP3 عملکرد منع‌کنندگی تومور را دارد (۲۳ و ۲۴). در سرطان سینه و پروستات، FOXP3 نقش تنظیم‌کنندگی بیان انکوژن‌ها و ژن‌های منع‌کننده‌ی تومور^{۲۸} و دیگر ژن‌های وابسته به سرطان را نیز بازی می‌کند (۲۵). از آنجا که mRNA مربوط به FOXP3 و پروتئین آن در تمام رده‌های سلول‌های سرطانی مشاهده می‌شود (۲۰)، از این رو نمی‌توان بیان ژن FOXP3 را در بافت‌های تومورهای حنجره که در مطالعه‌ی ما به دست آمده است به عنوان شاخص ارتشاح توموری با سلول‌های Treg محسوب نمود.

در هر صورت این ملکول در ساخت کمپلکس‌های هسته‌ای در تنظیم نسخه‌برداری چندین ژن هدف که در عملکرد منع‌کنندگی Treg مهم هستند، نقش بی‌همتایی را بازی می‌کند (۱۳).

سلول‌های Treg به شکل شایع در درون تومور اولیه، ندول‌های لنفوئیدی که در مسیر تخلیه تومور قرار

دارند و در گردش خون محیطی بیماران سرطانی مشاهده می‌شوند و افزایش سلول‌های Treg با پیش‌آگهی بد در بسیاری از تومورها مانند سرطان تخمدان، سینه، لنفوم و سرطان پاپیلری تیروئید توأم بوده است (۲۶). همبستگی مثبت میان بیان FOXP3 و پارامترهای پیشرفت کارسینوم سینه به سوی فنوتیپ تهاجمی تومور مانند تهاجم^{۲۹}، اندازه و پر عروقی^{۳۰} مشاهده شده است (۲۷).

همان‌طور که اشاره گردید، در مطالعه ما تفاوتی میان سطح بیان ژن FOXP3 میان بیماران با سرطان حنجره با و بدون تهاجم موضعی مشاهده نشد. این در حالی است که در جدیدترین مطالعه‌ای که انجام شده است تومورهای دهانی حلقی با مرحله‌ی انتهایی^{۳۱}، تعداد بیشتری از لنفوسیت‌های FOXP3+ را در مقایسه با بدخیمی‌های با مرحله‌ی آغازین^{۳۲} از خود نشان داده‌اند (۲۸).

همچنین در مطالعه‌ی ما سرطان حنجره با و بدون درگیری غدد لنفاوی، تفاوتی از لحاظ سطح بیان ژن FOXP3 از خود نشان نداد. این در حالی است که درصد سلول‌های Treg بیان‌کننده‌ی FOXP3 نه تنها در بیماران با کارسینوم سلول سنگفرشی حنجره به صورت چشمگیری بالاتر از افراد طبیعی بود بلکه بیماران با متاستاز به غدد لنفاوی نیز درصد بالاتری از سلول‌های Treg را از خود نشان دادند (۲۹).

در مطالعه‌ی بوسک (Boucek) و همکاران نیز سطوح بالای Treg در جریان خون محیطی با احتمال بالاتر عود تومور کارسینوم سلول سنگفرشی سر و گردن طی یک دوره‌ی ۲۴ ماهه، همراه بوده است (۳۰). این در حالی است که در دو مطالعه، سطوح سلول‌های Treg

²⁹ Invasion³⁰ Vascularity³¹ Late stage³² Early stage²⁷ Tolerance²⁸ Tumor suppressor genes

با پارامترهای بالینی و فاکتورهای پیش‌آگهی بقاء در بیماران HNSCC همبستگی‌ای یافت نشد (۳۱ و ۳۲). از این‌رو به‌نظر می‌رسد که بر اساس این دو مطالعه‌ی اخیر و نیز یافته‌های مطالعه کنونی، بررسی نقش پیش‌آگهی دهنده‌ی بیان ژن FOXP3 در درون سلول و سلول‌های Treg ارتشاح یافته در درون تومور حنجره (۳۳)، نیاز به مطالعات بیشتری دارد. هر چند که در مطالعه‌ی ما فراوانی و فنوتیپ سلول‌های Treg در تومور و سلول‌های تک سلولی خون محیطی اندازه‌گیری^{۳۳} نشده است ولی از آنجا که سلول‌های FOXP3 در درون تومورهای دهانی حنجره‌ای با درصد سلول‌های در گردش خون Treg که بیان‌کننده‌ی FOXP3 بوده‌اند همبستگی مثبتی را نشان داده‌اند (۲۸)، می‌توان پیش‌بینی کرد که سلول‌های Treg نیز در این بیماران افزایش از خود نشان می‌دهند.

در حقیقت در مطالعه‌ی حاضر، درصد سلول‌های Treg به‌صورت چشمگیری در بیماران با کارسینوم سلول سنگفرشی حنجره در مقایسه با گروه شاهد بالاتر بود و تحلیل همبستگی نیز نشانگر همبستگی این افزایش در سلول‌های Treg با افزایش بالاتر اندازه تومور و درگیری غدد لنفاوی^{۳۴} بود (۳۴).

در همین مطالعه‌ی اخیر، میزان بیان درون سلولی CTLA-4 در رده‌های گوناگون لنفوسیتی در بیماران با کارسینوم سلول سنگفرشی حنجره در مقایسه با گروه کنترل بالاتر بود (۳۴).

از محدودیت‌های عمده‌ی مطالعه‌ی ما، عدم وجود گروه کنترل است ولی در هر صورت بیان ژن CTLA-4 در ریز محیط تومور حنجره نشان می‌دهد

که این ملکول که نقش تنظیم‌کنندگی منفی پاسخ‌های ایمنی را دارد می‌تواند در تحمل ایمنی القاء شده تومورال مهم باشد (۳۵).

از این‌رو، پیش‌بینی می‌شد که میزان سطح بیان این آنتی‌ژن در ریز محیط تومورهای حنجره با میزان تهاجم موضعی و یا درگیری غدد لنفاوی در این بیماران، ارتباط داشته باشد، اما مطالعه‌ی ما این فرضیه را تأیید نمود.

این در حالی است که بیماران با سرطان سینه، سطح بالاتری از CTLA-4 و متاستازهای غدد لنفاوی زیر بغلی آشکار با مراحل بالاتر بالینی گسترش تومور را دارا بودند (۳۶).

از آنجا که آنتی‌بادی‌های ضد CTLA-4 موجب افزایش پاسخ‌های ایمنی (مانند ضد تومورال) می‌شوند، مطالعات گسترده‌تر بر نقش CTLA-4 در ایمنی ضد توموری سرطان حنجره می‌تواند بسیار امیدوارکننده باشد. در حقیقت دو مطالعه‌ی اخیر که از ipilimumab به‌عنوان آنتی‌بادی ضد CTLA-4 استفاده شده است، بهبودی شگرفی را در بقاء بیماران با ملانوم پیشرفته نشان داده‌اند (۱۴).

در مطالعه‌ی کارانیکاس (Karanikas) که بیان FOXP3 در بیست و پنج لاین سلول‌های سرطانی بررسی شد، مشاهده گردید که اینترلوکین ۱۰ و TGF- β 1 نیز تقریباً در تمام سلول‌های توموری بیان می‌شوند و سطوح این بیان نیز با بیان FOXP3 همبستگی مثبتی از خود نشان داد (۲۰). همان‌گونه که اشاره شد پدیده منع‌شدگی^{۳۵} از ریز محیط تومور در بیماران با HNSCC نیز با مجموعه‌ای از سلول‌های Treg که تولید اینترلوکین ۱۰ و TGF- β 1 می‌کنند، به‌وجود می‌آید (۱۹). این یافته‌ها نشانگر آن هستند که

³⁵ Suppression

³³ Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)

³⁴ L.N stage

بالینی و پاتولوژیک سرطان حنجره از لحاظ متاستاز، درگیری غدد لنفاوی و دست‌اندازی مکانی پیدا کنیم. تعداد بسیار کم بیماران با درگیری غدد لنفاوی و متاستاز در این مطالعه می‌تواند در نتایج تأثیرگذار باشد و از این رو پیشنهاد می‌شود که برای بررسی اثر تنظیم‌کنندگی ایمنی اینترلوکین ۱۰، FOXP3 و CTLA-4 در فرار ایمنی و پدیده‌ی تحمل و رویارویی با ایمنی ضدسلولی در سرطان حنجره، مطالعه‌ای بزرگ‌تر با تعداد فراوان‌تری از بیماران با درگیری‌های متنوع، همراه با اندازه‌گیری بیان این مارکرها در تومور و بیان FOXP3 و CTLA-4 در لنفوسیت‌های ارتشاح یافته در تومور و اندازه‌گیری فراوانی و فنوتیپ سلول‌های Treg انجام گردد. در هر صورت بررسی زیست‌شناسی و ملکولی سلول‌های Treg انباشت شده در ریز محیط تومور که موجب منع ایمنی ضدتومورال می‌شوند (۳۹)، می‌تواند دورنمای درمان سرطان را ترسیم نماید زیرا حذف و تخلیه (Depletion) سلول‌های T FOXP3+ ممکن است بتواند ایمنی سلولی را در بعضی از بیماران سرطانی افزایش دهد (۴۰ و ۴۱).

اینترلوکین ۱۰ در هماهنگی با بیان FOXP3 نقش چشمگیری در به‌وجود آوردن توانایی سلول‌های توموری برای فرار از سیستم ایمنی بازی می‌کند (۲۰). بیماران با کارسینوم سلول سنگفرشی حنجره، به‌صورت چشمگیری دارای سطح سرمی بالاتری از اینترلوکین ۱۰ در مقایسه با گروه کنترل بوده و این میزان اینترلوکینی با فعالیت بیماری و مرحله‌بندی تومور همبستگی از خود نشان داد (۳۷).

در مطالعه‌ای دیگر نیز سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ نه تنها در بیماران با HNSCC در مقایسه با گروه شاهد بالاتر بوده است بلکه این سطوح نیز با بقاء بدتر، بعد از یک پیگیری ۳۶ ماهه، توأم بوده است (۳۱).

اینترلوکین ۱۰ به‌عنوان یک سیتوکین تنظیم‌کنندگی ایمنی (Immunomodulatory) در انواع گوناگون سرطان افزایش می‌یابد. وجود این اینترلوکین در متاستازهای پیشرفته و همبستگی مثبت میان سطوح آن و پیشرفت بیماری، دلالت بر اهمیت این اینترلوکین در ریز محیط تومورال دارد (۳۸).

با این وجود، در مطالعه‌ی کنونی، ما نتوانستیم تفاوتی را از لحاظ میزان بیان ژن اینترلوکین ۱۰ با ویژگی‌های

References:

1. O'Regan EM, Timon C, Sheils O, et al. Squamous cell carcinoma of the head and neck in young Irish adults. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2006; 44: 203-6.
2. Mafi N, Kadivar M, Hosseini N, et al. Head and neck squamous cell carcinoma in Iranian patients and risk factors in young adults: a fifteen-year study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 3373-8.
3. Saedi B, Razmpa E, Sadeghi M, et al. The epidemiology of laryngeal cancer in a country on the esophageal cancer belt. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 2009; 61: 213-7.
4. Chikamatsu K, Albers A, Stanson J, et al. P53(110-124)-specific human CD4+ T-helper cells enhance in vitro generation and antitumor function of tumor-reactive CD8+ T cells. *Cancer Res* 2003; 63: 3675-81.
5. Strauss L, Bergmann C, Gooding W, et al. The frequency and suppressor function of CD4+CD25highFoxp3+ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6301-11.
6. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 263-74.
7. Byrne WL, Mills KH, Lederer JA, et al. Targeting regulatory T cells in cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 6915-20.
8. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10: 942-9.
9. Ohkura N, Sakaguchi S. Regulatory T cells:

- roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol* 2010; 32: 95-106.
10. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, et al. FoxP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 490-500.
11. Schott AK, Pries R, Wollenberg B. Permanent up-regulation of regulatory T-lymphocytes in patients with head and neck cancer. *Int J Mol Med* 2010; 26: 67-75.
12. Gasparoto TH, de Souza Malaspina TS, Benevides L, et al. Patients with oral squamous cell carcinoma are characterized by increased frequency of suppressive regulatory T cells in the blood and tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59: 819-28.
13. Wing K, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation. *Trends Immunol* 2011; 32: 428-33.
14. Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 1043-51.
15. Abe H, Yamanishi T, Mashidori T, Arai K, et al. Significant association of interleukin 10 receptor mRNA levels with renal cell carcinoma metastasis. *Biomed Res* 2008; 29: 19-25.
16. Simeone E, Ascierto PA. Immunomodulating antibodies in the treatment of metastatic melanoma: the experience with anti-CTLA-4, anti-CD137, and anti-PD1. *J Immunotoxicol* 2012; 9: 241-7.
17. Sredni B, Weil M, Khomenok G, et al. Ammonium trichloro (dioxoethylene-o,o') tellurate (AS101) sensitizes tumors to chemotherapy by inhibiting the tumor interleukin 10 autocrine loop. *Cancer Res* 2004; 64: 1843-52.
18. Alas S, Emmanouilides C, Bonavida B. Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 709-23.
19. Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M, et al. A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4345-54.
20. Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M, et al. Foxp3 expression in human cancer cells. *J Transl Med* 2008; 6: 19.
21. Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH, et al. Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 8344-50.
22. Ebert LM, Tan BS, Browning J, et al. The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells. *Cancer Res* 2008; 68: 3001-9.
23. Zhang HY, Sun H. Up-regulation of Foxp3 inhibits cell proliferation, migration and invasion in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett* 2010; 287: 91-7.
24. Wang L, Liu R, Li W, et al. Somatic single hits inactivate the X-linked tumor suppressor FOXP3 in the prostate. *Cancer Cell* 2009; 16: 336-46.
25. Frattini V, Pisati F, Speranza MC, et al. FOXP3, a novel glioblastoma oncosuppressor, affects proliferation and migration. *Oncotarget* 2012; 3: 1146-57.
26. French JD, Weber ZJ, Fretwell DL, et al. Tumor-associated lymphocytes and increased FoxP3+ regulatory T cell frequency correlate with more aggressive papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 2325-33.
27. Gupta S, Joshi K, Wig JD, et al. Intratumoral FOXP3 expression in infiltrating breast carcinoma: Its association with clinicopathologic parameters and angiogenesis. *Acta Oncol* 2007; 46: 792-7.
28. Green VL, Michno A, Stafford ND, et al. Increased prevalence of tumour infiltrating immune cells in oropharyngeal tumours in comparison to other subsites: relationship to peripheral immunity. *Cancer Immunol Immunother* 2013. [Epub ahead of print]
29. Chen B, Lu LM, Tao L, et al. Expression and clinical significance of CCR6, CCR7 and CD4(+)CD25(+) Foxp3(+) regulatory T cells in laryngeal squamous cell carcinoma and neck lymphatic metastasis. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2010; 45: 759-64.
30. Boucek J, Mrkván T, Chovanec M, et al. Regulatory T cells and their prognostic value for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Cell Mol Med* 2010; 14: 426-33.
31. Alhamarneh O, Agada F, Madden L, et al. Serum IL10 and circulating CD4(+)CD25(high) regulatory T cell numbers as

- predictors of clinical outcome and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2011; 33: 415-23.
32. Green VL, Irune E, Prasai A, Alhamarneh O, et al. Serum IL10, IL12 and circulating CD4+CD25high T regulatory cells in relation to long-term clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Int J Oncol* 2012; 40: 833-9.
 33. Martin F, Ladoire S, Mignot G, et al. Human FOXP3 and cancer. *Oncogene* 2010; 29: 4121-9.
 34. Erfani N, Khademi B, Haghshenas MR, et al. Intracellular CTLA4 and regulatory T cells in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Immunol Invest* 2013; 42: 81-90.
 35. Tarhini AA, Iqbal F. CTLA-4 blockade: therapeutic potential in cancer treatments. *Onco Targets Ther* 2010; 3: 15-25.
 36. Mao H, Zhang L, Yang Y, et al. New insights of CTLA-4 into its biological function in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2010; 10: 728-36.
 37. Gunaydin RO, Kesikli SA, Kansu E, Hosal AS. Identification of the peripheral blood levels of interleukin-12, interleukin-10, and transforming growth factor-beta in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2012; 34: 393-7.
 38. Sato T, Terai M, Tamura Y, Alexeev V, et al. Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol Res* 2011; 51: 170-82.
 39. Wang Y, Ma Y, Fang Y, et al. Regulatory T cell: a protection for tumour cells. *J Cell Mol Med* 2012; 16: 425-36.
 40. Triulzi T, Tagliabue E, Balsari A, et al. FOXP3 expression in tumor cells and implications for cancer progression. *J Cell Physiol* 2013; 228: 30-5.
 41. deLeeuw RJ, Kost SE, Kakal JA, et al. The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 3022-9.

Original Article

FOXP3, CTLA-4 & IL-10 genes expression in patients with laryngeal cancer and corresponding metastases

A. Bolkheir¹, B. Khademi², M. Habib Agahi³, A. Ghaderi⁴,
A. Hosseini⁴, M. Jaberipour^{4*}

¹ School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Fars, IRAN

² Department of Otolaryngology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Fars, IRAN

³ Department of Immunology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Fars, IRAN

⁴ Shiraz Institute for Cancer Research, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Fars, IRAN

(Received 5 Mar, 2013 Accepted 27 Apr, 2013)

Abstract

Background: Treg cells are the most potent suppressants of antitumoral activity of immune system and expression of CTLA-4 is essential for activation of FOXP3+ T-cells. IL-10 is an immunosuppressor which is one of the major obstacles of specific tumoral T-cells. Objective of this study was comparison of expression of FOXP3, CTLA-4 & IL10 genes among patients with and without laryngeal cancer local metastasis and patients with lymph node involvement.

Material and Methods: 59 patients with laryngeal cancer which 8 of them had local metastasis were enrolled in this study. Also 31 samples of lymph node tissues were taken. The percentage and expression of FOXP3, CTLA-4 & IL10 genes were investigated by Real-Time PCR.

Results: The results indicated that there were not any significant difference between laryngeal cancer patients with or without local metastasis and also between patients with or without lymph node involvement in percentage of FOXP3, CTLA-4 and IL-10 genes expression ($P>0/05$). As well as there were no statistical association with the genes expression and different stages and pathological differentiation of tumors ($P>0/05$).

Conclusion: There is no significant association between percentage of expression of FOXP3, CTLA-4 and IL-10 genes in our patients with laryngeal tumor considering local invasion extension and lymph node involvements.

Keywords: laryngeal cancer, FOXP3, CTLA-4, IL-10

*Address for correspondence: Shiraz Institute for Cancer Research, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Fars, IRAN; E-mail: Jaberipourm@gmail.com